研究用試薬

取扱説明書

(Version 1.2)

■本製品には無細胞翻訳に必要な細胞抽出液などは含まれておりませんので、別途ご用意ください。(大腸菌由来の製品(プロテイン・エクスプレス社 RYTS kit、5PRIME 社 RTS100 *E.coli* HY kit など)を推奨)

■包装袋のラベルに記載されている有効期限内に必ずご使用ください。

■本製品は研究用試薬ですので、臨床診断用途には使用しないでください。

■万一、試薬などが目や皮膚に付着した場合、また飲み込んだりした場合には、すみやかに医師に相談し、その指示に従ってください。

■廃棄される場合は、各施設の化学物質廃棄要領に従ってください。

株式会社プロテイン・エクスプレス
URL : http://www.proteinexpress.co.jp
〒260-0856 千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-15
千葉大亥鼻イノベーションプラザ内
TEL : 043-202-5755
FAX : 043-202-5756
E-mail : tech@proteinexpress.co.jp

目次

1. はじめに

CloverDirect™ tRNA Reagents for Site-Directed Protein Functionalization は、無細胞翻訳系を利用してタンパク質の指定した部位に非天然アミノ酸を導入するための試薬です。導入部位の指定は終止コドンの1つである UAG コドン(アンバーコドン)または CGGG コドン(4 塩基コドン)で行います。本製品の非天然アミノ酸-tRNA は UAG コドンまたは CGGG コドンを読み取り、非天然アミノ酸を導入します。この際、終結因子(UAG コドンの場合)または Arg-tRNA(CGGG コドンの場合)が読み取ると、タンパク質合成は途中で停止します。したがって、完全長タンパク質として合成されたものは、100%の効率で非天然アミノ酸が導入されていることになります。

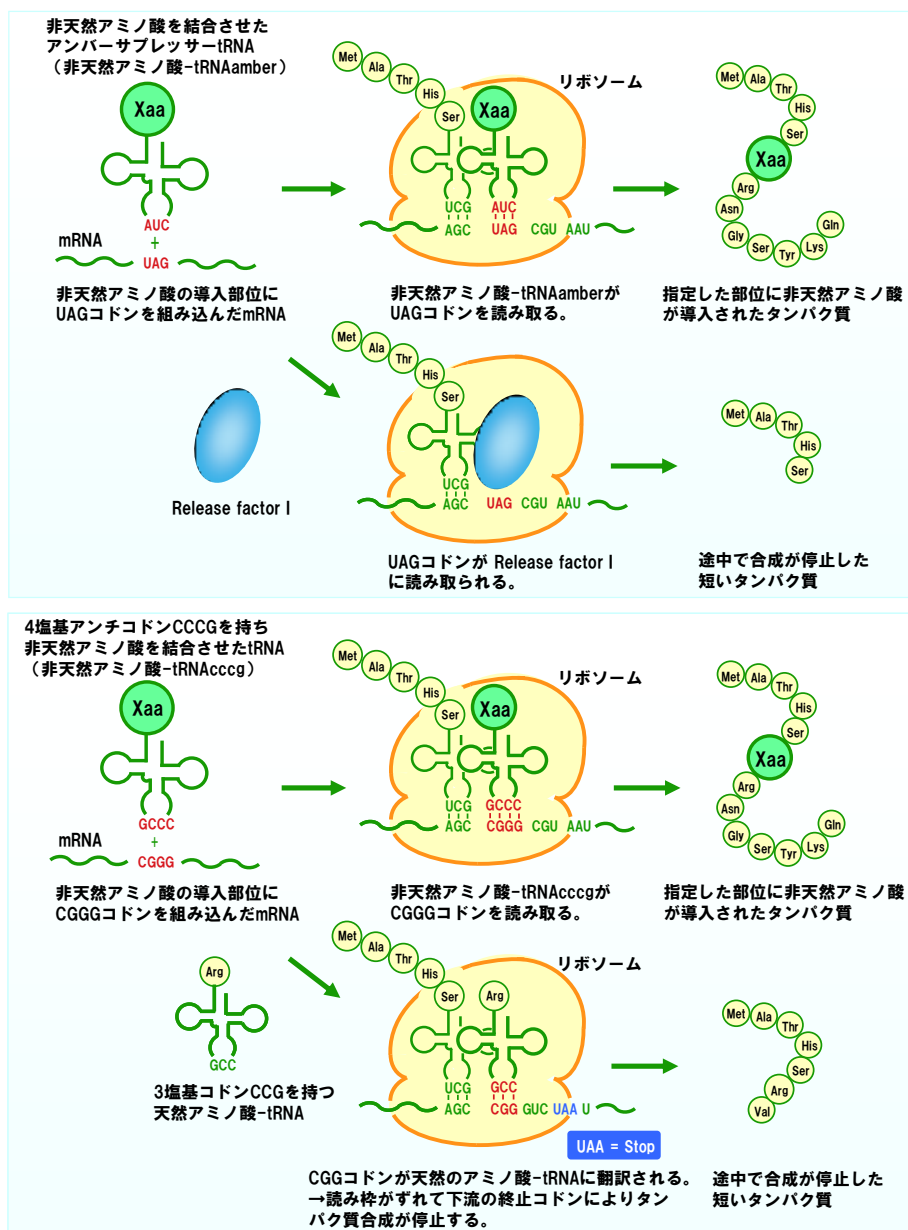



Figure 1： 非天然アミノ酸の導入原理(上:UAG コドン、下:CGGG コドン)

2. 製品内容

■ 本製品に含まれるもの

・非天然アミノ酸-tRNA	1 本
・tRNA buffer	1 本

※ 非天然アミノ酸の構造等は別途書類にてご確認ください。
1 本につき 300μL の翻訳反応が行えます。小スケールで反応を行う場合、非天然アミノ酸-tRNA を溶解して使用後、残りの溶液は−80℃にて 2 ヵ月間保存できます。

■ 保存条件

・−80℃

■ 品質保持期限

・未使用の状態 ： 包装袋のラベルに記載
・tRNA buffer 溶解後は−80℃で 2 ヶ月

■ **別途用意する試薬**

(タンパク質発現)

・無細胞翻訳系試薬(大腸菌由来)
(例 ：RTS100 *E.coli* HY kit; 5PRIME, #2401100)
・導入部位に UAG コドンまたは CGGG コドンを持つ発現遺伝子
(環状 DNA, 直鎖状 DNA, または mRNA)
(ご使用になる無細胞翻訳系に最適なベクターをご使用ください。)

(精製・バッファー置換、濃縮)

・精製用カラム(レジン), およびバッファー
(例 ：His SpinTrap™ kit; GE ヘルスケアバイオサイエンス, #28-9321-71)
・Ultrafiltration Membrane, およびバッファー
(例 ：ULTRAFREE®-0.5 Centrifugal Filter Devices 10k; ミリポア, UFV5BC00)

※ 他社製試薬キットは一例です。ご使用目的に合わせて選択してください。

3.　発現遺伝子の作製

本製品を使用する場合、UAG コドンまたは CGGG コドンを組み込んだ遺伝子を、別途ご用意下さい。その際、以下の点を考慮して頂く必要があります。

非天然アミノ酸の導入位置について

■ 非天然アミノ酸のタンパク質への導入は、非天然アミノ酸の構造に大きく依存しています。特に、構造の大きい非天然アミノ酸は N 末端から 20 残基以内とすることを推奨します。非天然アミノ酸の導入部位特性は、弊社ホームページ (http://www.proteinexpress.co.jp/j/products/reagent/cloverdirect_7.htm)もしくは製品カタログをご参照下さい。

■ 非天然アミノ酸の導入部位の周辺配列や、mRNA の 2 次構造、タンパク質の種類によっては、非天然アミノ酸の導入効率が低い場合があります。また、UAG コドンや CGGG コドンが読み飛ばされて、非天然アミノ酸の導入されていないタンパク質が発現する場合もあります。

■ TAMRA などの蛍光標識アミノ酸の場合は、タンパク質の N 末端領域に導入することを推奨します。多くのタンパク質では N 末端への導入は活性や構造に大きな影響を与えないと考えられることから、標識の影響を最小限にすることができます。具体的には、(i) 開始メチオニンの直後、(ii) N 末端タグ配列の下流、などがあります。弊社では、オリジナルのタグ配列 ProX™ tag を推奨します。

ProX™ tag (Figure 2)とは、Clover*Direct*™ によるタンパク質の効率的な発現を目的として、弊社が開発したオリジナルのタグ配列です。ProX™ tag は、大腸菌の無細胞翻訳系での発現量が高いタンパク質の N 末端領域の遺伝子配列を一部改変したもので、非天然アミノ酸が取り込まれる位置、およびその前後の配列を最適化しています。ProX™ tag を目的のタンパク質の N 末端に付加することで、タンパク質発現量と、非天然アミノ酸の導入効率を向上させる効果が期待されます。特に、以下のようなケースでは、ProX™ tag を使用することをお薦めいたします。

5’-	AUG	UCU	AAA	CAA	AUC	GAA	GUA	AAC	**UAG or CGGG**	UCU	AAU	GAG	-3’
	Met	Ser	Lys	Gln	Ile	Glu	Val	Asn	**Xaa**	Ser	Asn	Glu	

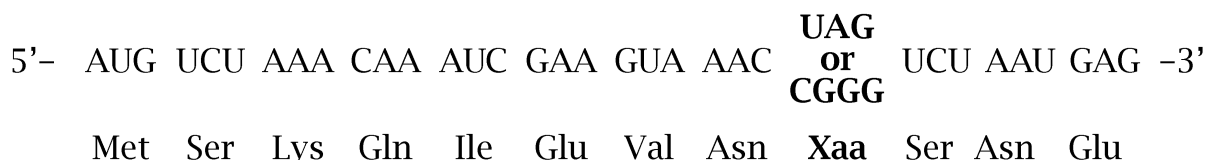



Figure 2 : ProX ™ tag 配列

Case1. タンパク質自体の発現量が低い。
タンパク質の種類によっては、無細胞翻訳系での発現量が非常に低いものがあります。そのような場合には N 末端にタグを付加することが有効ですが、ProX™ tag はその効果に加えて、非天然アミノ酸の導入効率を高める効果もあるために、非天然アミノ酸導入タンパク質の収量の向上が期待できます。

Case2. 非天然アミノ酸の導入されていないタンパク質が発現してしまう。
周辺配列によっては、UAG コドンまたは CGGG コドンが読み飛ばされて、非天然アミノ酸の導入されていないタンパク質が発現してしまう場合があります。ProX™ tag は、周辺配列が最適化されていますので、そのような呼び飛ばしが抑制されています。

発現遺伝子の配列について

- 非天然アミノ酸導入タンパク質を精製する場合は、C 末端への His tag 等の精製用タグ配列の付加を推奨します。翻訳後の反応液中には、途中で停止した短いタンパク質、取り込まれなかった非天然アミノ酸のほか、無細胞翻訳系由来のタンパク質などが混在していますが、His tag を利用することで、容易に非天然アミノ酸導入タンパク質を精製することができます。

- UAG コドンをご使用の場合、発現遺伝子の C 末端の終止コドンが UAG の場合は、他の終止コドン(UAA または UGA)に置換してください

- CGGG コドンをご使用の場合、遺伝子の読み枠に CGG コドンが存在すると、本製品の非天然アミノ酸-tRNA が誤って CGG を認識してしまうことがあります。発現遺伝子中の CGG コドンは、CGU や CGC などの別のアルギニンのコドンに置換しておく必要があります。

- CGGG コドンの下流には、読み枠がずれた場合に終止コドンが現われる必要があります(Figure 1 下を参照)。下流に終止コドンが現れない場合は、終止コドン(UAA,UAG,UGA のいずれか)が生じるように、変異を加えることを推奨します。
  例)CGGG AGU ACC GUU GGC AAC GGU の場合、5 番目の GGC を GGU(グリシンの同義コドン)に置換することで、CGGG AGU ACC GUU GG<u>U AA</u>C GGU (下線部は読み枠がずれた場合に生じる終止コドン)とすることができます。

4.　プロトコール

4-1.　無細胞翻訳

用意する試薬

・非天然アミノ酸-tRNA
・tRNA buffer
・無細胞翻訳系試薬　(大腸菌由来の製品（ロシュ・ダイアグノスティック社 RTS100 *E.coli* HY Kit など）を推奨)
・非天然アミノ酸導入部位にUAGコドンまたはCGGGコドンを持つ発現遺伝子(環状 DNA, 直鎖状 DNA, または mRNA)

実験を始める前の注意事項

■ 非天然アミノ酸-tRNA の乾燥粉末がチューブの蓋等に付着している場合がありますので、tRNA bufferを加える前に遠心して粉末をチューブの底に落としてください。その後、非天然アミノ酸-tRNA のチューブに <u>30 µL</u> の tRNA buffer を加えて、完全に溶解してください。

■ 非天然アミノ酸-tRNA は、－80℃で保存してください。一度溶解した非天然アミノ酸-tRNA 溶液は、氷上に置き、使用後は速やかに－80℃に保存してください。溶解後はお早めに使用してください。適切に保存しなかった場合は、非天然アミノ酸-tRNA が加水分解されてしまい、非天然アミノ酸導入タンパク質の合成量が著しく低下する場合があります。

■ 非天然アミノ酸-tRNA はヌクレアーゼによって容易に分解されてしまいます。ヌクレアーゼの混入を防ぐために手袋を着用し、RNase, DNase フリーの反応チューブやチップの使用を推奨します。

■ 非天然アミノ酸の導入されていないタンパク質の発現の有無を確認するために、非天然アミノ酸-tRNA を添加しないコントロール反応を行うことをお勧めします。

以下には無細胞翻訳系として5PRIME社 RTS100 *E.coli* HY Kitを用いる場合の試薬の調製法について示します。他の無細胞翻訳系を用いる場合には、その製品の所定の反応組成に従って混合してください。その場合には、翻訳反応液10 μLに対して、溶解後の非天然アミノ酸-tRNA溶液を1 μL使用してください。

※ タンパク質の種類によっては、本試薬を使用しても非天然アミノ酸導入タンパク質の発現ができない場合がありますので、最初に小スケール(10 μL)での発現確認をすることをお勧めします。また、ご使用目的に合わせて50 μL以上へのスケールアップも可能です。

※ 非天然アミノ酸導入タンパク質の発現量は非天然アミノ酸-tRNAの濃度によって増加する場合もあります。コントロール遺伝子としてChloramphenicol Acetyltransferase (CAT)遺伝子を発現させた場合の発現量の比較を行っておりますのでご参照ください (page 8：Figure 3) 。

反応組成

(ロシュ・ダイアグノスティックス社 RTS100 *E. coli* HY kitを用いる場合)

成分	容量(μL)
RNase フリー水	5
環状DNA (100 ng /μL), または直鎖状DNA (100 ng/μL), またはmRNA (8 μg/μL)	5
アミノ酸	12
メチオニン	1
反応ミックス	10
非天然アミノ酸-tRNA溶液	5
E. coli ライセート	12
Total	50

※非天然アミノ酸-tRNA を添加しないコントロール反応を行う場合は、非天然アミノ酸-tRNA溶液の代わりにRNaseフリー水またはtRNA bufferを添加してください。

操作手順

(Step1)　非天然アミノ酸-tRNA の乾燥粉末がチューブの蓋等に付着している場合がありますので、tRNA buffer を加える前に遠心して粉末をチューブの底に落としてください。その後、非天然アミノ酸-tRNA のチューブに 30 µL の tRNA buffer を加えて、完全に溶解してください。

(Step2)　RNase フリー水、環状 DNA(または直鎖状 DNA, mRNA)、アミノ酸、メチオニン、反応ミックスを、反応用チューブに混合してください。

(Step3)　Step1 で調製した非天然アミノ酸-tRNA 溶液 5 µL と、*E.coli* ライセート 12 µL を、Step2 の反応液にすばやく混合してください。溶液が均一になるようにゆっくりピペッティングした後、30℃、30 分～2 時間インキュベートしてください。
残った非天然アミノ酸-tRNA は－80℃で保存し、お早めに使用してください。

(Step4)　サンプルを氷上に移して反応を停止し、SDS-PAGE 等で発現確認を行ってください。(参照 page 9 : 4-2. 非天然アミノ酸導入タンパク質の発現確認)

参考データ

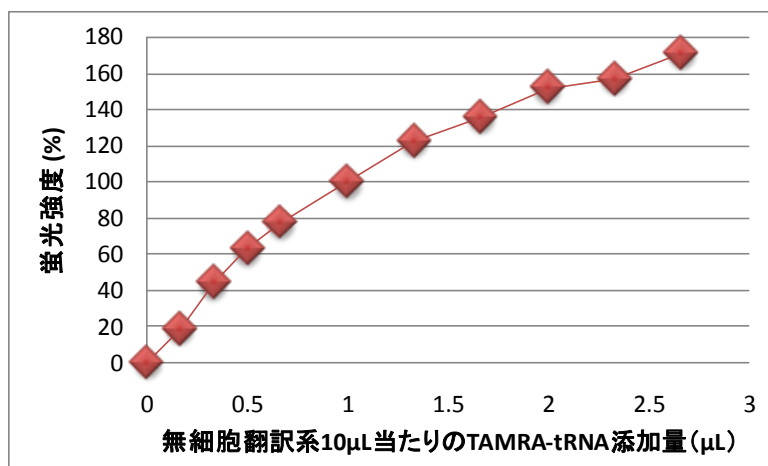



Figure 3 : TAMRA-tRNA と発現量の比較

TAMRA-tRNA (製品名: Clover*Direct*™ TAMRA , Cat.No.: CLD02, CLD06)を様々な濃度で添加して Chloramphenicol Acetyltransferase (CAT)遺伝子を発現させた場合の TAMRA 導入タンパク質発現量を、SDS-PAGE ゲルの蛍光イメージ測定により比較した。
(無細胞翻訳系 10µL 当たりの TAMRA-tRNA 添加量 1µL の蛍光強度を 100%とした。)

4-2. ピンポイント標識タンパク質の発現例

非天然アミノ酸導入タンパク質は、SDS-PAGE で分離し、蛍光色素の場合は、直接ゲルを蛍光イメージャーで検出できます。また、その他非天然アミノ酸を導入した場合は、タグペプチド抗体などによるウエスタンブロットによって検出することができます(Figure 4)。通常は 1 レーン当たり、0.25〜1 μL の無細胞翻訳反応液で十分検出できます。

※ 反応液の中にはタンパク質に取り込まれなかった遊離の標識アミノ酸が多く含まれています。この遊離の標識アミノ酸は SDS-PAGE での検出において泳動先端に確認されます。

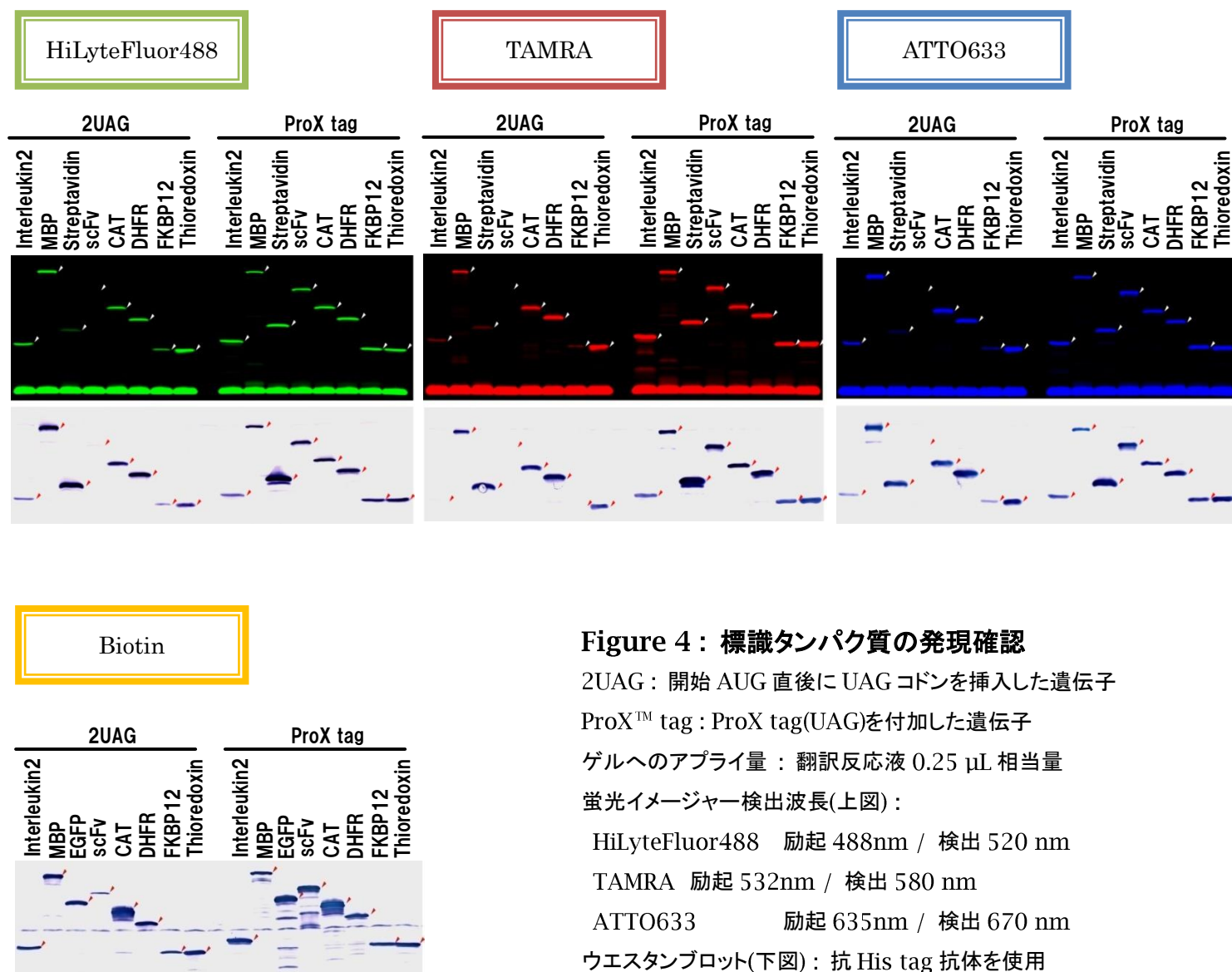



Figure 4： 標識タンパク質の発現確認

2UAG： 開始 AUG 直後に UAG コドンを挿入した遺伝子

ProX™ tag : ProX tag(UAG)を付加した遺伝子

ゲルへのアプライ量 ： 翻訳反応液 0.25 μL 相当量

蛍光イメージャー検出波長(上図)：

HiLyteFluor488 励起 488nm / 検出 520 nm

TAMRA 励起 532nm / 検出 580 nm

ATTO633 励起 635nm / 検出 670 nm

ウエスタンブロット(下図)： 抗 His tag 抗体を使用

(ビオチン標識タンパク質の検出には抗ビオチン抗体を使用)

※ ProX™ tag は Clover*Direct*™ によるタンパク質の効率的な標識を目的として、弊社が開発したオリジナルのペプチドタグです。

4-3. 精製(例:His tag 精製)

反応液の中には無細胞翻訳系のタンパク質が混在し、また非天然アミノ酸が導入されずに途中で停止した短いタンパク質や、導入されなかった非天然アミノ酸も含まれていますが、His tag などのタグを使用した精製によって、非天然アミノ酸導入タンパク質を単離することができます。以下には、His tag の精製カラムとして GE ヘルスケアバイオサイエンス社 His SpinTrap™ Column を用いる場合について説明します。

※ 他の精製タグ、精製カラムを用いる場合には、そのタグ、製品の所定の方法に従って精製を行ってください。

別途用意する試薬

- ・His SpinTrap™ Column (GE ヘルスケアバイオサイエンス社製)
- ・Wash buffer
  (20 mM Phosphate buffer (pH7.4) / 0.5 M NaCl / 60 mM imidazole / 0.1% Polyoxyethylene(23)Lauryl Ether)
- ・Elute buffer
  (20 mM Phosphate buffer (pH7.4) / 0.5 M NaCl / 0.5 M imidazole / 0.1% Polyoxyethylene(23)Lauryl Ether)

実験を始める前の注意事項

■ 初めて精製するタンパク質については、以下の各ステップで溶液を回収し、SDS-PAGE で確認することをお勧めします。

操作手順

(Step1)　His SpinTrap™ Column の底部を折り、2 mL チューブにセットしてください。(1.5 mL チューブを用いた場合、1 回の遠心ですべての溶液が排出されません)

(Step2)　70～100 x *g* で 1 分間遠心してください。その後、排出液を捨ててください。

(Step3)　500 μL の Wash buffer をカラムに加え、70～100 x *g* で 1 分間遠心してください。その後、排出液を捨ててください。

(Step4)　翻訳反応液 50 μL と Wash buffer 350 μL をカラムに加えてレジンとゆっくりと馴染ませてください。

(Step5)　10 分間室温で放置後、70～100 x *g* で 1 分間遠心してください。

(Step6)　排出液をチューブから取り除き、500 μL の Wash buffer をカラムに加えてください。70～100 x *g* で 1 分間遠心してください。この操作を合計 3 回繰り返してください。

(Step7)　最後の遠心が終わったら、カラムを新しい 2 mL チューブにセットしてください。

(Step8)　Elute buffer 200 μL をカラムに加えて 10 分間室温で放置後、70～100 x *g* で 1 分間遠心してください。

(Step9)　再び Step8 の操作を行ってください。

(Step10)　Step8,9 で得られた溶出溶液を混合してください。

※　溶出液は高濃度の NaCl, imidazole を含みます。測定に影響を及ぼす場合には、別途バッファー置換を行ってください。

5. トラブルシューティング

■ タンパク質の合成量が少ない、あるいは全く合成されない	
1) 試薬の使用期限が切れている。	特注品の場合、使用期限を設けておりませんが、お早めにお使いください。
2) 試薬の保存状態が適切でない。	−80℃で保存して、一旦溶解したものはお早めにお使い下さい。
3) DNase, RNase の混入。	手袋等を着用し、ヌクレアーゼの混入には十分注意してください。
4) 遺伝子の塩基配列が適切でない。	正しい読み枠で UAG コドンまたは CGGG コドンが挿入されていることを確認してください。
5) 無細胞翻訳系では発現が困難な遺伝子である。	ProX ™ tag を使用することによって改善される場合もありますのでお試しください。

■ タンパク質の活性が低い、あるいは全くみられない。	
1) ジスルフィド結合が必要なタンパク質である。	酸化型グルタチオン(GSSG)を翻訳反応中に入れると改善される場合があります。 (終濃度 10 mM 程度)
2) 翻訳後修飾が必要なタンパク質である。	大腸菌由来の無細胞翻訳合成系では翻訳後修飾はされません。
3) タンパク質が正常にフォールディングされていない。	タンパク質の種類によっては、通常の条件下ではフォールディングされない可能性があります。リフォールディング条件を検討してください。

■精製後の非天然アミノ酸導入タンパク質の純度が低い。	
1) 精製がうまく行われていない。	精製条件(洗浄回数、イミダゾール濃度など)を検討してください。
2) 精製後も遊離の非天然アミノ酸が混入している。	ゲルろ過などによる脱塩処理を行ってください。

■蛍光イメージ、ウエスタンブロットによる確認ができない。	
1) 波長が合っていない。	適切な波長に設定してください。
2) SDS-PAGEに用いるサンプル量が少ない。	用いるサンプル量を増やしてください。
3) 非天然アミノ酸導入タンパク質が合成できていない。	前ページを参照してください。

■蛍光イメージ、ウエスタンブロットにより複数のバンドが観察される。	
1) 非天然アミノ酸導入タンパク質の発現に異常がある	遺伝子配列によっては、非天然アミノ酸の上流のペプチドが切除される場合があります。また、フレームシフトによって途中で翻訳が停止したものが発現する場合もあります。精製操作での除去を試みてください。
2) ウエスタンブロットで非特異的なバンドが生じている。	抗体の種類によっては、無細胞翻訳系由来のタンパク質と結合する場合があります。別の抗体をお試しください。

上記の解決法で改善できない場合は弊社までご相談ください。

6. Q&A

Q : 無細胞翻訳系としてロシュ・ダイアグノスティックス社の RTS100 を推奨していますが、他社や自作の大腸菌無細胞翻訳系でも使用できますか?
A : 基本的には使用できます。ただし、メーカーによっては非天然アミノ酸導入タンパク質の発現効率が低い場合があります。

Q : 大腸菌以外の無細胞翻訳系に使用できますか?
A : 本製品は大腸菌の無細胞翻訳系用に開発した試薬です。
それ以外の無細胞翻訳系でも使用できる可能性はありますが、非天然アミノ酸の導入効率が低下する場合があります。

7. 参考文献

1) FRET analysis of protein conformational change through position-specific incorporation of fluorescent amino acids
Daisuke Kajihara, Ryoji Abe, Issei Iijima, Chie Komiyama, Masahiko Sisido, Takahiro Hohsaka
Nature Methods., 3, 923-929 (2006).

2) Position-specific incorporation of biotinylated non-natural amino acids into a protein in a cell-free translation system
Takayoshi Watanabe, Norihito Muranaka, Issei Iijima, and Takahiro Hohsaka
Biochem. Biophys. Res. Commun., 361, 794-799 (2007)

3) Comprehensive screening of amber suppressor tRNAs suitable for incorporation of non-natural amino acids in a cell-free translation system
Hikaru Taira, Yosuke Matsushita, Kenji Kojima, Kaori Shiraga, Takahiro Hohsaka *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 374, 304-308 (2008).

4) Efficient Incorporation of Nonnatural Amino Acids with Large Aromatic Groups into Streptavidin in In Vitro Protein Synthesizing Systems
Takahiro Hohsaka, Daisuke Kajihara, Yuki Ashizuka, Hiroshi Murakami, and Masahiko Sisido
J. Am. Chem. Soc., 121, 34-40 (1999).

5) 無細胞翻訳系における非天然アミノ酸の導入技術の開発とその応用, 芳坂 貴弘
生化学, 72(3), 247-253 (2007).

6) 遺伝暗号を拡張した人工タンパク質合成系の開発と応用, 芳坂 貴弘
生物物理, 47(2), 124-128 (2007).

8. 製品紹介

ピンポイント蛍光標識 [for Fluorescence Labeling]

CloverDirect™ CR110-X-AF-tRNA [5-CR110-X : Abs/Em = 498/521nm]
CloverDirect™ HiLyte Fluor™ 488-AF-tRNA [HiLyte Fluor™ 488 : Abs/Em = 497/525nm]
CloverDirect™ TAMRA-X-AF-tRNA [5(6)-TAMRA-X : Abs/Em = 546/575nm]
CloverDirect™ ATTO 633-AF-tRNA [ATTO633 : Abs/Em = 629/657nm]
CloverDirect™ ATTO 655-X-AF-tRNA [ATTO655-X : Abs/Em = 633/684nm]

ピンポイントビオチン標識 [for Fluorescence Labeling]

CloverDirect™ Biotin-AF-tRNA [Biotin]
CloverDirect™ Biotin-X-AF-tRNA [Biotin-X]
CloverDirect™ Biotin-XX-AF-tRNA [Biotin-XX]

翻訳後修飾 [for Post-translational Modification]

CloverDirect™ Lys(Me)-tRNA [ε-methyl-Lys]
CloverDirect™ Lys(Me_2)-tRNA [ε-dimethyl-Lys]
CloverDirect™ Lys(Ac)-tRNA [ε-acetyl-Lys]

非天然アミノ酸導入 [for Unnatural Mutagenesis]

PEG 標識アミノ酸

CloverDirect™ PEG4-AF-tRNA [Methyl-PEG4]
CloverDirect™ PEG8-AF-tRNA [Methyl-PEG8]
CloverDirect™ PEG12-AF-tRNA [Methyl-PEG12]

架橋アミノ酸

CloverDirect™ BPA-tRNA [*p*-benzoyl-phenylalanine]
CloverDirect™ AcPhe-tRNA [*p*-acetyl-phenylalanine]

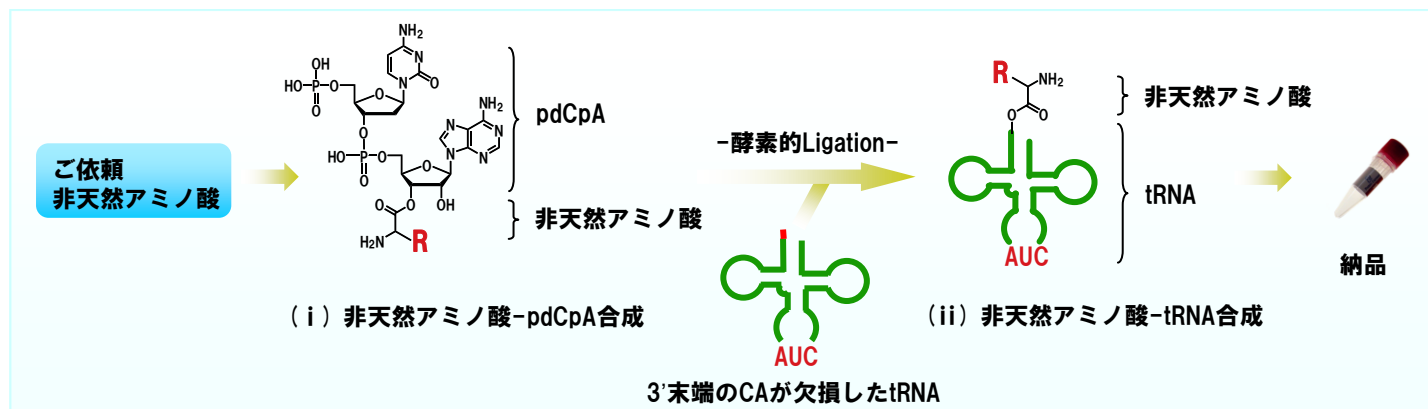
光異性化アミノ酸

CloverDirect™ azoAla-tRNA [*p*-phenylazophenyl-alanine]

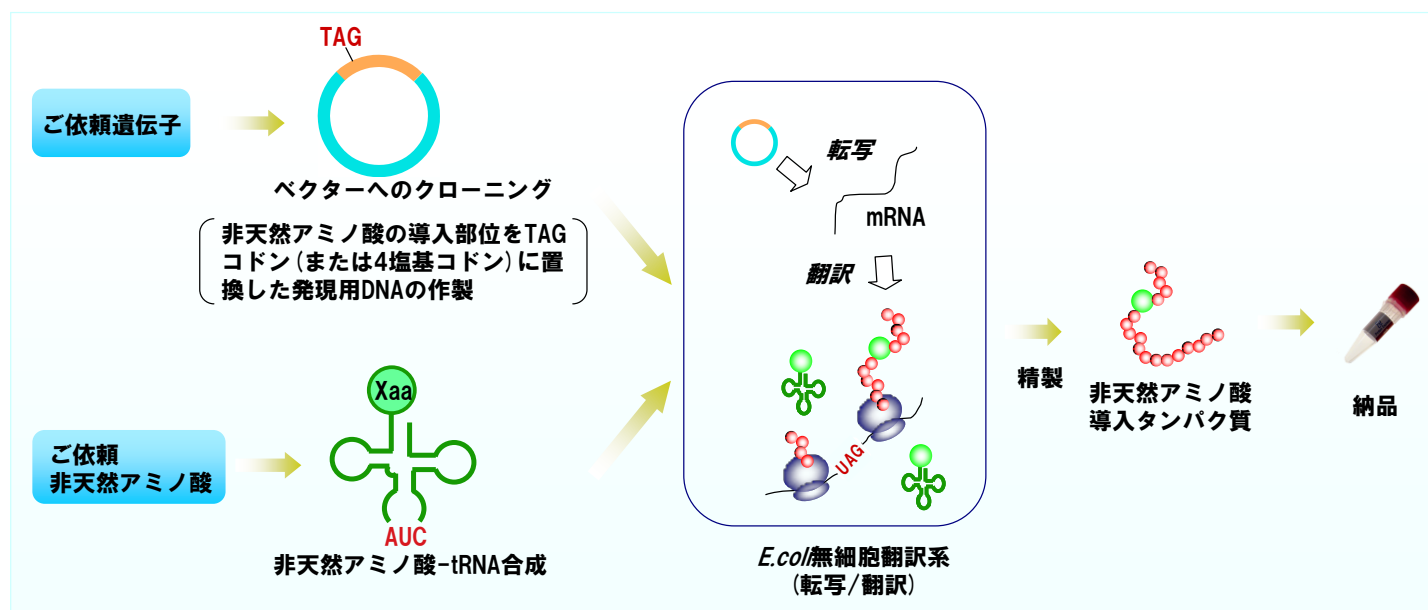
製品の詳細、その他非天然アミノ酸-tRNA につきましては。ホームページよりご覧ください。
(http://www.proteinexpress.co.jp/j/products/reagent/cloverdirect_1.htm)

9. 受託サービスのご案内

非天然アミノ酸-tRNA 受託合成サービス

ご希望の非天然アミノ酸を結合させた tRNA を作製いたします。オリジナルの非天然アミノ酸導入タンパク質の合成が可能になります。

非天然アミノ酸tRNA受託合成サービス

非天然アミノ酸導入タンパク質の受託合成サービス

UAG コドンあるいは CGGG コドンを用いて、ご希望の非天然アミノ酸を目的の部位へピンポイントに導入したタンパク質を、*E.coli* 由来の無細胞発現系を用いて合成いたします。また、設立以来、組み換えタンパク質生産の専門技術を持つ会社として蓄積されたタンパク質発現に関わる知識とノウハウを活かして、遺伝子の合成からタンパク質の精製までトータルサポート致します。

非天然アミノ酸導入タンパク質のトータル受託合成サービス

10. 製品についてのお問い合わせ先

株式会社プロテイン・エクスプレス
URL : http://www.proteinexpress.co.jp
〒260-0856　千葉県千葉市中央区亥鼻 1-8-15
千葉大亥鼻イノベーションプラザ内
TEL ： 043-202-5755
FAX ： 043-202-5756
E-mail ： tech@proteinexpress.co.jp